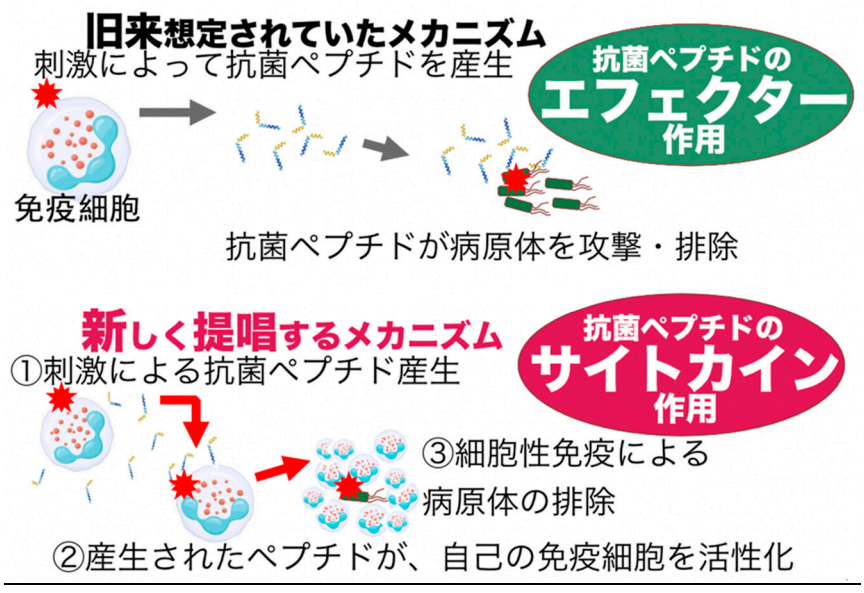
140　自然免疫の作動原理に関する研究	宮下　惇嗣

【目的】自然免疫システムは、無脊椎動物から脊椎動物まで広く保存され、感染防御の第一線を担っている。しかしながら、その駆動・調節原理については不明点が多く残されており、自然免疫システムの異常に起因すると考えられる疾患（炎症性ショックや自己免疫疾患等）の制御も達成できていない。自然免疫システムの研究は、1990 年代にショウジョウバエの toll 受容体が、それまで知られていた発生における機能だけでなく感染防御における機能（免疫学的機能）を有していることが報告されたのち、哺乳動物の toll 様受容体も相同因子として同様の免疫学的機能を有していることが提唱されて以後急速に進展した。しかしながら、その過程で未解決となっている疑問も多く残されている。本研究では、1990 年代に Lemaitre や Hoffmann（上記のショウジョウバエ toll 受容体の免疫機能の発見者）らによって提唱され、現在でも自然免疫領域における主流のパラダイムとなっている「抗菌ペプチドはエフェクター（＝病原体を攻撃する分子）である」という考え方を転換する根拠となる情報を取得することを試みた。

【方法】本研究では、モデル動物としてカイコを用いた。カイコにはいくつかの抗菌ペプチドが存在するが、その中でも大腸菌死菌などの免疫刺激によって体液中に誘導されるセクロピン B を用いて実験を始めた。本研究で用いた抗菌ペプチドはいずれも Fmoc 固相アミノ酸合成法によって取得された。まずセクロピン B をカイコに前投与し、緑膿菌に対する感染抵抗性の獲得を指標として、当該ペプチドの免疫調節機能を評価した。また、同様の実験を、異種性の抗菌ペプチドを用いて行った。また、FPLC システムを用いたゲル濾過カラムクロマトグラフィーにおいて、セクロピン B の挙動と当該活性（前投与によって、カイコに感染抵抗性を付与する活性）の挙動を比較した。

【結果】セクロピン B を前投与（緑膿菌接種の 3 時間前）されたカイコは緑膿菌に対する感染抵抗性を示した。セクロピン B の溶解に用いた生理食塩水を前投与（3 時間前）されたカイコは緑膿菌に対する感染抵抗性を示さなかった。また、セクロピン B の投与と同時に緑膿菌を接種されたカイコも、緑膿菌に対する感染抵抗性を示さなかった。また、セクロピン B 以外の異種性の抗菌ペプチドも、カイコに対して同様の活性を示した。FPLC ゲル濾過カラムクロマトグラフィーにおいては、活性のピークとペプチドのピークは 1 フラクション分ずれて現れた。

抗菌ペプチドの生体内における新たな機能の提唱



140. 自然免疫の作動原理に関する研究

宮下　惇嗣

帝京大学 医真菌研究センター

Key words：自然免疫，抗菌ペプチド，カイコ，生化学

緒　言

免疫系を構成する自然免疫システムは、動物界では無脊椎動物から脊椎動物までその機能がよく保存され、感染防御の最前線を担っていると考えられている。自然免疫システムの作動原理の普遍性については、1990 年代にショウジョウバエの toll 受容体の感染防御における重要性［1］や、その相同因子である哺乳動物の Toll 様受容体（Toll-like receptor：TLR）による異物認識［2］といった知見が立て続けに報告され、その後両受容体そのものだけでなくその細胞内シグナル伝達カスケードの相同性が示されたことが根拠となっている。また、1990 年代前半の時点で、toll 受容体（その時点でショウジョウバエの発生における機能が知られていた）の細胞内情報伝達経路とインターロイキン 1（interleukin-1：IL-1）の細胞内情報伝達経路が、分子レベルで相同性を示すことが指摘されており［3］、自然免疫システムは動物界において普遍的に存在する細胞内メカニズムにより構成されている、という見方が一般的になった。

哺乳動物では自然免疫システムに加えて獲得免疫システムが機能しており、そこでは主に樹状細胞等による抗原提示の仕組みによって、自然免疫システムによる異物認識を引き金として獲得免疫システムを駆動する仕組みが実装されている。哺乳動物の獲得免疫システムにおいては、免疫グロブリンタンパク質（抗体）を産生する仕組みが中心的な役割を演じているが、免疫グロブリンをコードする遺伝子は一部の脊椎動物にしか存在しないことから、哺乳動物の獲得免疫システムは動物界全体を見渡すとむしろ特殊なシステムで、動物界全体においては自然免疫システムが感染防御の主役であると言える。さらに、ヒトの臨床現場においては、依然としてワクチンによる感染制御が達成できていない感染症が多いこと、急性期の炎症性ショック（自然免疫システムの過剰な応答と考えられる）のコントロールは極めて不良で落命率が高いこと、また慢性炎症・アレルギー・自己免疫疾患といった免疫関連疾患の撲滅が達成できていないことからも、私たちの免疫システムに関する理解が不十分であることが推察される。私はこうした課題に対して、自然免疫システムに関する我々の見方を転換する必要があると考えており、特に、これまで見過ごされていた自然免疫調節因子を同定することによって、自然免疫システムの普遍的で新しい駆動・調節原理に迫ろうとしている。本研究では、近年筆者らが報告したカイコにおける immune priming 現象（免疫刺激成分を前投与することによって、カイコが感染抵抗性を獲得する現象）［4，5］に着目し、抗菌ペプチドがカイコに対する免疫刺激活性を有するか否か、異種性の抗菌ペプチド（ショウジョウバエ並びにヒト由来）がカイコに対して同様の免疫刺激活性を有するか否かを検証した。さらに、当該ペプチドによる免疫刺激活性について、カラムクロマトグラフィーにおけるペプチドの挙動と活性の挙動の一致が見られるか否かについて検証した。

方　法

1．実験に用いた動物（カイコ）

カイコの卵を愛媛蚕種株式会社（愛媛県、日本）から購入し、孵化後の幼虫に人工餌 Silkmate 2S（日本農産工業株式会社、神奈川県、日本）を与えて 27℃で飼育した。4 令幼虫期の最終日（実験者が形態により識別可能）

に個体を分離し、翌日 5 令に脱皮した個体（5 令 1 日目）に餌を与えて 27℃で一晩飼育したのち、翌日（5 令 2 日目）のカイコ個体を実験に用いた。

2. 抗菌ペプチド

本研究ではセクロピン B（カイコの抗菌ペプチド）、L5（センチニクバエの抗菌ペプチドのアミノ酸配列改変体）、および LL-37 ペプチドを用いた。セクロピン B および L5 は、ユーロフィンジェノミクス株式会社（東京都、日本）に Fmoc 固相合成を委託し、HPLC 分析で純度 90%以上であることを確認した。LL-37 は合成品を AnaSpec 社（米国カリフォルニア州）から購入した（製品番号 #AS-61302）。

3. カイコを用いた免疫活性試験

抗菌ペプチドまたは溶解に用いた生理食塩水は、1 mL ツベルクリン用シリンジ（27 G 針つき）を用いてカイコの血管内に注射した。その後、2.5～3.0 時間カイコを 27℃で餌を与えずに飼育し、緑膿菌の生菌懸濁液を血管内に注射した。用いた緑膿菌生菌懸濁液は、緑膿菌の終夜培養液を生理食塩水で 10^6 倍に希釈したものを用いた。緑膿菌を接種した後のカイコは 37℃で餌を与えずに飼育し、20 時間後の生存数を記録した。本実験を、最初に溶解した抗菌ペプチドの濃度を変えて（希釈系列を作成して）行うことにより、ペプチドによるカイコの感染抵抗性獲得について、用量依存性を検討した。

4. カラムクロマトグラフィーによる、セクロピン B の自然免疫増強活性の検証

FPLC システム（AKTA GO、Cytiva 社）を用いて、セクロピン B 溶液を分離した。分離に用いたカラムは Superdex 75 10/300 GL、Cytiva 社）で、移動相には生理食塩水を用いた。溶出画分は SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離し、CBB 染色によってペプチドを検出した。また、各溶出画分の希釈系列を作製してカイコに対する免疫活性を試験し、各溶出画分の当該活性を定量した。

結果および考察

1. 各種抗菌ペプチドの、カイコに対する免疫活性

セクロピン B、L5、並びに LL-37 はいずれも、カイコに前投与することによって、カイコの緑膿菌感染抵抗性を導いた（図 1）。また、その効果は用量依存的であり、カイコの生存率は最も高い場合で 100%に達した（図 1）。溶解に用いた生理食塩水を前投与されたカイコ（図 1）における横軸が 0 の点は、緑膿菌感染によって翌日全頭のカイコが死亡した。また、カイコに対してこれらのペプチドを緑膿菌接種と同時に投与した場合には、緑膿菌感染によって翌日全頭のカイコが死亡した。以上の結果は、カイコの抗菌ペプチド（セクロピン B）に加えて、ショウジョウバエの抗菌ペプチド（L5）やヒトの抗菌ペプチド（LL-37）も、カイコに対する自然免疫刺激活性を有することを示唆している。特に、感染に用いた緑膿菌と同時の投与では感染防御効果を示さず、緑膿菌の接種に先だってあらかじめそれらの抗菌ペプチドを投与しておくことが感染防御効果に必要だったことから、当該抗菌ペプチドによる感染防御効果は緑膿菌に対する直接的な抗菌活性ではなく、カイコの免疫系に対する作用よりもたらされていると考えられる。

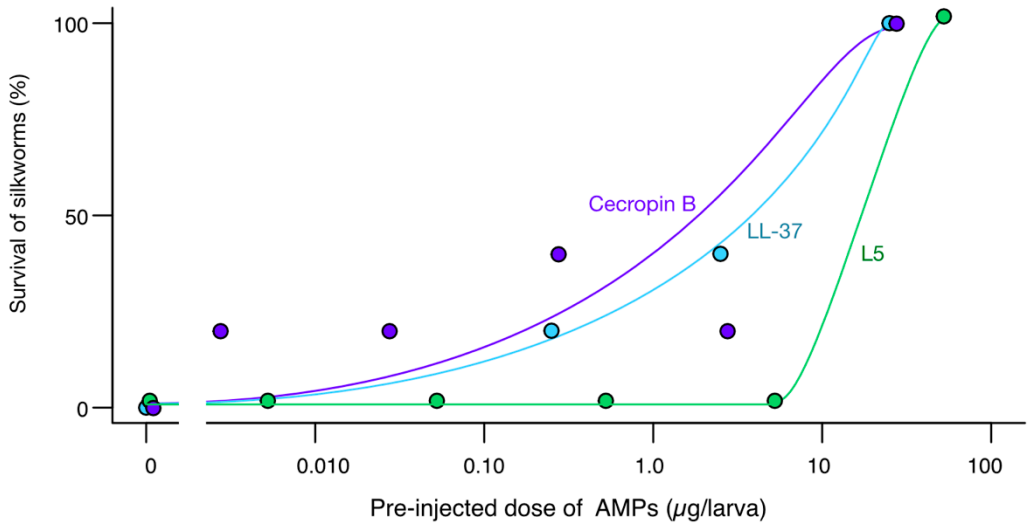


図 1. カイコに対する各種抗菌ペプチドの自然免疫増強活性

カイコに対してセクロピン B（Cecropin B）、L5、LL-37 を投与し、3 時間後に緑膿菌生菌を接種してから 20 時間後のカイコ生存数を計測した。図中には各サンプルの各用量における実験結果（n＝5）から生存率を算定し、プロットした。横軸はカイコに投与したペプチドの用量（μg/larva）、縦軸は緑膿菌感染後のカイコの生存率（%）を表す。

2. カイコに対するセクロピン B による免疫活性の生化学的検証

本研究では次に、セクロピン B を用いて、カイコに対する免疫活性（前投与によって緑膿菌感染抵抗性を誘導する活性）の生化学的検証を行った。本研究で用いたセクロピン B は合成品であり、合成時に HPLC で純度が 90%以上であることが確認されているが、当該ペプチドサンプルによるカイコに対する免疫活性がサンプル中のセクロピン B によって説明されるか否かを検証する目的で、FPLC システムのゲル濾過カラムクロマトグラフィーによって当該サンプルを分離したのち、ペプチドの挙動とカイコに対する免疫活性の挙動が一致する否かを検討した。その結果、FPLC ゲル濾過カラムクロマトグラフィーにおいて、セクロピン B の溶出位置と免疫活性の溶出位置はおおよそ一致するものの、ペプチドピークの内部を細かく分画して活性を追跡すると、活性はペプチドピークの前半に集中しており、ペプチドピーク全体の挙動とは一致しないことが判明した（図 2）。この結果から、次の二つの可能性が考えられる。一つ目は、今回用いたペプチドサンプルにセクロピン B 以外のコンタミネーション物質 X が存在していて、X がカイコに対する免疫活性の実体であり、かつ X がゲル濾過カラムクロマトグラフィーにおいてセクロピンのごく近傍に溶出された可能性である。X の例としては例えば細菌由来のペプチドグリカン（以前、グラム陰性細菌のペプチドグリカンはカイコに対する免疫活性があることを筆者らが報告している［4，5］などが挙げられる。二つ目は、今回用いたサンプル中のセクロピン B ペプチドに、分子的な不均一性が存在する可能性である。セクロピン B はおよそ 40 アミノ酸残基からならなるペプチドで、アルファヘリックスに富んだ立体構造をとると考えられているが、一般にペプチドの水溶液中における立体構造にはある程度の自由度がある。今回の結果を説明する一つの可能性として、セクロピン B ペプチドの立体構造はいくつかのパターンがあり、それらは FPLC のゲル濾過カラムクロマトグラフィーで完全には分離できないが、溶出ピーク内である程度の偏りがあり、特にピークの前半に溶出される形の立体構造のものにカイコに対する免疫活性がある、という解釈が考えられる。立体構造は温度による影響を受けるため、加温や冷却の影響によって当該ペプチドの活性量や、カラムクロマトグラフィーにおける溶出パターンに変化があるか否かを今後の検証課題としたい。また、各溶出フラクションの CD スペクトラムを測定するのも重要な実験であると考えられる。

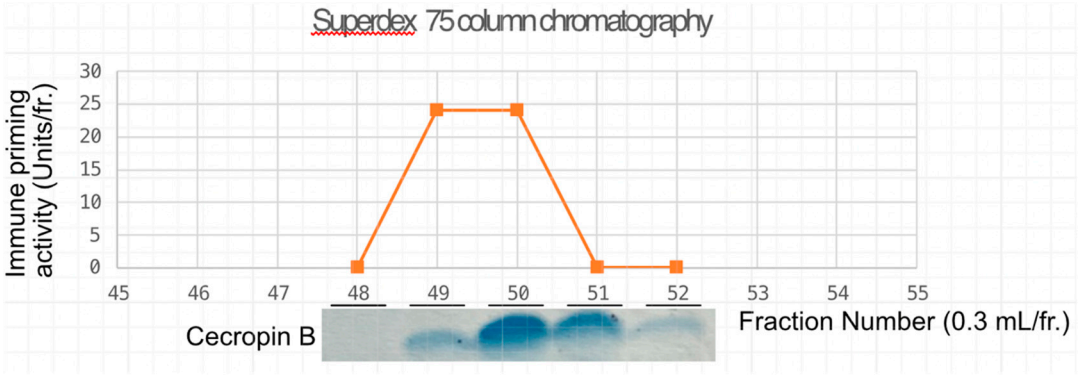


図 2. カイコに対する、セクロピン B による免疫活性の生化学的検証

上図は横軸に FPLC ゲル濾過カラムクロマトグラフィー（使用カラムは Superdex 75 10/300 GL）におけるフラクション番号を示し、縦軸にカイコに対する免疫活性量（各画分の希釈系列をカイコに前投与して免疫試験を行うことによって算出した）を示す。また、グラフの下にフラクション番号 48～52 の SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって得られたセクロピン B ペプチドのバンドを示した（電気泳動に用いたサンプルのロットは、カイコに注射して免疫試験を行ったものと同一）。本実験では、セクロピンペプチドはフラクション番号 50 付近に溶出されたが、その付近のカイコに対する免疫活性を定量したところ、活性はフラクション番号 49～50 に出現した。また、その活性量は各フラクションにおけるセクロピン B の存在量とは対応していなかった。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、帝京大学大学院医療技術学研究科の三上雄大（博士課程学生）、武蔵野大学薬学部の石井雅樹博士、並びに帝京大学薬学部の関水和久博士である。また、本研究を遂行するにあたり、研究助成による多大なご支援を賜りました公益財団法人上原記念生命科学財団に深謝いたします。

文　献

1） Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart J-M, Hoffmann JA. The dorsoventral regulatory gene cassette spätzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults. Cell. 1996;86(6):973-83. PMID: 8808632 DOI: 10.1016/s0092-8674(00)80172-5

2） Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu M-Y, Huffel CV, Du X, et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. Science. 1998;282(5396):2085-8. PMID: 9851930 DOI: 10.1126/science.282.5396.2085

3） Wasserman SA. A conserved signal transduction pathway regulating the activity of the rel-like proteins dorsal and NF-kappa B. Molecular biology of the cell. 1993;4(8):767-71. PMID: 8241564 DOI: 10.1091/mbc.4.8.767

4） Miyashita A, Kizaki H, Kawasaki K, Sekimizu K, Kaito C. Primed immune responses to gram-negative peptidoglycans confer infection resistance in silkworms. J Biol Chem. 2014;289(20):14412-21. Epub 2014/04/08. PMID: 24706746 DOI: 10.1074/jbc.M113.525139.

5） Miyashita A, Takahashi S, Ishii K, Sekimizu K, Kaito C. Primed Immune Responses Triggered by Ingested Bacteria Lead to Systemic Infection Tolerance in Silkworms. PLoS One. 2015;10(6):e0130486. Epub 2015/06/25. PMID: 26107254 DOI: 10.1371/journal.pone.0130486.